

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

AL

特開平10-80270

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月31日

(51) Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 9/64			C12N 9/64	Z
C07H 21/04			C07H 21/04	B
C07K 14/52			C07K 14/52	
C12N 5/10			C12P 21/02	F
15/09	ZNA		C12N 5/00	B
審査請求 未請求 請求項の数16 F D (全14頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平9-156062

(22) 出願日 平成9年(1997) 5月30日

(31) 優先権主張番号 特願平8-207691

(32) 優先日 平8(1996) 7月19日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000155908

株式会社林原生物化学研究所  
岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72) 発明者 谷本 忠雄

岡山県岡山市山崎312番地の88

(72) 発明者 栗本 雅司

岡山県岡山市学南町2丁目7番25号

(54) 【発明の名称】 ポリペプチドをプロセッシングする酵素

(57) 【要約】

【課題】 免疫担当細胞において I F N -  $\gamma$  の産生を誘導するポリペプチドの前駆体に作用し、これを活性型のポリペプチドに変換する手段を提供することを課題とする。

【解決手段】 免疫担当細胞においてインターフェロナー  $\gamma$  の産生を誘導するポリペプチドの前駆体を活性型のポリペプチドに変換する酵素と、その酵素を産生し得る細胞を増殖させる工程と、増殖細胞から酵素を採取する工程を含んでなる酵素の製造方法と、免疫担当細胞においてインターフェロナー  $\gamma$  の産生を誘導するポリペプチドの前駆体に当該酵素を作用させて活性型のポリペプチドに変換するポリペプチドの変換方法により解決する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫担当細胞においてインターフェロン- $\gamma$ の産生を誘導するポリペプチドの前駆体を活性型のポリペプチドに変換する酵素。

【請求項2】 N末端に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列の一部又は全部を含有する前駆体の、配列番号1に示すアミノ酸配列における第36番目のアスパラギン酸と第37番目のチロシンの間のペプチド結合を切断する請求項1に記載の酵素。

【請求項3】 配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列（ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表すものとする。）を含有する前駆体に作用して、その前駆体をN末端に配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を含有する活性型のポリペプチドに変換する請求項1又は2に記載の酵素。

【請求項4】 下記の理化学的性質を性質を有する請求項1、2又は3に記載の酵素。

## (1) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約25,000ダルトン及び約10,000ダルトンを示す。

## (2) 部分アミノ酸配列

部分アミノ酸配列として、配列表における配列番号4（ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、アスパラギン又はアスパラギン酸を表すものとする。）及び／又は配列番号5に示すアミノ酸配列を含有する。

## (3) 活性阻害剤

アセチル-L-チロシル-L-バリル-L-アラニル-L-アスパルト-1-アール及びヨードアセトアミドにより酵素活性が阻害される。

【請求項5】 ヒト造血系細胞から得ることのできる請求項1、2、3又は4に記載の酵素。

【請求項6】 免疫担当細胞においてインターフェロン- $\gamma$ の産生を誘導するポリペプチドの前駆体を活性型のポリペプチドに変換する酵素としての下記の理化学的性質を有する蛋白質。

## (1) 作用

N末端に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列の一部又は全部を含有する前駆体の、配列番号1に示すアミノ酸配列における第36番目のアスパラギン酸と第37番目のチロシンの間のペプチド結合を切断する。

## (2) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約25,000ダルトン及び約10,000ダルトンを示す。

## (3) 部分アミノ酸配列

部分アミノ酸配列として、配列表における配列番号4

（ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、アスパラギン又はアスパラギン酸を表すものとする。）

及び／又は配列番号5に示すアミノ酸配列を含有する。

## (4) 活性阻害剤

アセチル-L-チロシル-L-バリル-L-アラニル-L-アスパルト-1-アール及びヨードアセトアミドにより酵素活性が阻害される。

## (5) 産生細胞

ヒト造血系細胞から得ることができる。

【請求項7】 請求項1乃至6に記載の酵素又は蛋白質を産生し得る細胞を増殖させる工程と、増殖細胞から酵素を採取する工程を含んでなる請求項1乃至6に記載の酵素又は蛋白質の製造方法。

【請求項8】 細胞がヒト造血系細胞である請求項7に記載の酵素又は蛋白質の製造方法。

【請求項9】 細胞をヒト以外の温血動物に移植し、その温血動物の体液を利用しながら増殖させる請求項7又は8に記載の酵素又は蛋白質の製造方法。

【請求項10】 温血動物が齧歯類である請求項9に記載の酵素又は蛋白質の製造方法。

【請求項11】 酵素又は蛋白質を塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び／又は等電点電気泳動により採取する請求項7、8、9又は10に記載の酵素又は蛋白質の製造方法。

【請求項12】 免疫担当細胞においてインターフェロン- $\gamma$ の産生を誘導するポリペプチドの前駆体に請求項1乃至6に記載の酵素又は蛋白質を作用させて活性型のポリペプチドに変換するポリペプチドの変換方法。

【請求項13】 前駆体がN末端に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列の一部又は全部を含有し、酵素又は蛋白質がそのアミノ酸配列における第36番目のアスパラギン酸と第37番目のチロシンの間のペプチド結合を切断する請求項12に記載のポリペプチドの変換方法。

【請求項14】 前駆体が配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列（ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表すものとする。）を含有する請求項12又は13に記載のポリペプチドの変換方法。

【請求項15】 活性型のポリペプチドがN末端に配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を含有する請求項12、13又は14に記載のポリペプチドの変換方法。

【請求項16】 活性型のポリペプチドが配列表における配列番号6に示すアミノ酸配列（ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表すものとする。）を含有する請求項12、13、14又は15に記載のポリペプチドの変換方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明はポリペプチドをプロセッシングする酵素に関するものであり、詳細には、免疫担当細胞においてインターフェロン- $\gamma$ （以下、「IFN- $\gamma$ 」と略記する。）の産生を誘導するポリペプチドの前駆体を活性型のポリペプチドに変換する酵素に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】本発明者らは、免疫担当細胞において IFN- $\gamma$  の産生を誘導するポリペプチドの単離と、そのポリペプチドをコードする cDNA のクローニングに成功し、特願平 6-27189 号明細書（特開平 8-27189 号）及び特願平 7-262062 号明細書（特開平 8-193098 号）に開示した。このポリペプチドは有用な生理活性蛋白質である IFN- $\gamma$  の産生を誘導する性質と、キラー細胞による細胞障害性を増強したり、キラー細胞の生成を誘導する性質を兼備しているため、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、抗免疫疾患剤などとして広範な用途が期待されている。

【0003】ところで、ヒト細胞においては、遺伝子の発現により生成したポリペプチドは細胞内酵素によるプロセッシングを受け、ポリペプチドの一部が切断されたり、糖鎖が付加したりすると言われている。医薬品に配合するポリペプチドとしては、ヒト細胞における同様のプロセッシングを受けたものが望ましいところ、特願平 8-269105 号明細書に記載されているように、ヒト細胞は一般に当該ポリペプチドの産生量が少ないという問題がある。本発明者がその原因について鋭意研究したところ、ヒト細胞において、当該ポリペプチドは、通常、生理活性を有しない、分子量約 24,000 ダルトンの前駆体として存在していることが判明した。当該ポリペプチドにかぎらず、多くのサイトカインは、通常、まず、生理活性を有しない前駆体として産生され、その後、細胞内酵素によるプロセッシングを受けて活性型のポリペプチドに変換されることが知られている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】斯かる状況に鑑み、この発明の第一の課題は、免疫担当細胞において IFN- $\gamma$  の産生を誘導するポリペプチドの前駆体に作用し、これを免疫担当細胞において IFN- $\gamma$  の産生を誘導する活性型のポリペプチドに変換する酵素を提供することにある。

【0005】さらに、この発明の第二の課題は、斯かる酵素を製造する方法を提供することにある。

【0006】加えて、この発明の第三の課題は、斯かる酵素を用いて当該ポリペプチドの前駆体を免疫担当細胞において IFN- $\gamma$  の産生を誘導する活性型のポリペプチドに変換する方法を提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者が上記諸課題を解決すべく鋭意研究したところ、ある種のヒト細胞から採取した酵素は当該ポリペプチドの前駆体に作用し、これを免疫担当細胞において IFN- $\gamma$  の産生を誘導する活性型のポリペプチドに変換することを見出した。そして、この酵素は人為的に増殖させた種々の細胞、とりわけ、ヒト造血系細胞を用いて製造し得ることを確認してこの発明を完成した。

【0008】すなわち、この発明は前記第一の課題を、免疫担当細胞において IFN- $\gamma$  の産生を誘導するポリペプチドの前駆体を活性型のポリペプチドに変換する酵素により解決するものである。

【0009】さらに、この発明は前記第二の課題を、斯かる酵素を産生し得る細胞を培養する工程と、増殖細胞から酵素を採取する工程を含んでなる酵素の製造方法により解決するものである。

【0010】加えて、この発明は前記第三の課題を、免疫担当細胞において IFN- $\gamma$  の産生を誘導するポリペプチドの前駆体に斯かる酵素を作用させて活性型のポリペプチドに変換するポリペプチドの変換方法により解決するものである。

## 【0011】

【発明の実施の形態】前述のとおり、この発明は、免疫担当細胞において IFN- $\gamma$  の産生を誘導するポリペプチドの前駆体を活性型のポリペプチドに変換する酵素の発見に基づくものである。この発明でいう前駆体は、通常、還元剤存在下の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において分子量約 24,000 ダルトンを示し、例えば、当該ポリペプチドを本来的に産生する細胞内、あるいは、当該ポリペプチドをコードする領域を含む DNA（例えば、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列の DNA）を導入することによって形質転換した哺乳類由来の宿主細胞内に存在する。斯かる前駆体は、通常、N 末端には配列表における配列番号 1 に示すアミノ酸配列の一部又は全部を、また、全体としては、配列表における配列番号 2 に示すアミノ酸配列（ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表すものとする。）の全部、又はその N 末端の一部が欠失したアミノ酸配列を含有し、そのままでは免疫担当細胞において IFN- $\gamma$  の産生を誘導しない。

【0012】しかしながら、この前駆体にこの発明の酵素を作用させると、前駆体の配列番号 1 に示すアミノ酸配列における第 36 番目のアスパラギン酸と第 37 番目のチロシンの間のペプチド結合が切断され、N 末端に配列表における配列番号 3 に示すアミノ配列を有する活性型のポリペプチドに変換され、この活性型のポリペプチドは、単独又は適宜補因子を共存させると、免疫担当細胞において IFN- $\gamma$  の産生を誘導する。活性型のポリペプチドは、通常、全体として、配列表における配列番

号6に示すアミノ酸配列(ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表すものとする。)を含有し、還元剤存在下のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において分子量18,000乃至19,500ダルトンを示す。

【0013】したがって、この発明でいう酵素とは、それが上述のごときポリペプチドの前駆体に作用し、免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導する活性型のポリペプチドを生成するかぎり、天然のものであっても人工的に創成したものであってもよく、その構造や出所・由来は問わない。なお、ヒト造血系細胞から得られるこの発明の酵素は、通常、下記の理化学的性質を有する。

#### (1) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約25,000ダルトン及び約10,000ダルトンを示す。

#### (2) 部分アミノ酸配列

部分アミノ酸配列として、配列表における配列番号4

(ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、アスパラギン又はアスパラギン酸を表すものとする。)及び/又は配列番号5に示すアミノ酸配列を含有する。

#### (3) 活性阻害剤

アセチル-L-チロシル-L-バリル-L-アラニル-L-アスパルト-1-アール(以下、「Ac-YVAD-CHO」と略記する。)及びヨードアセトアミドにより酵素活性が阻害される。

【0014】斯かる酵素は、細胞を給源とするこの発明の方法により製造することができる。給源として用いる細胞に特に制限はなく、当該酵素の産生能と増殖能を有するかぎり、天然の細胞であっても、天然の細胞をもとに人工的に創製した細胞株や形質転換細胞であってもよい。この発明を実施するうえで特に有用なのは細胞株及び形質転換細胞であり、前者の細胞株は、例えば、リンパ芽球、リンパ球、単芽球、単球、骨髓芽球、骨髓球、顆粒球及びマクロファージを始めとするヒト造血系細胞、さらには、顎下腺類表皮癌、肺癌、大腸癌及び結腸癌由来の腫瘍細胞を含む上皮系細胞、神経芽細胞並びに間質系細胞を培養株化して得られる細胞株が挙げられる。個々の細胞株としては、例えば、ジュン・ミノワダ

『キャンサー・レビュー』、第10巻、1乃至18頁(1988年)などに記載されている骨髓性白血病、前骨髓性白血病、単球性白血病、成人T細胞白血病、ヘアリー細胞白血病を含む白血病及びリンパ腫由来のHBL-38細胞、HL-60細胞(ATCC CCL-240)、K-562細胞(ATCC CCL-243)、KG-1細胞(ATCC CCL-246)、Mo細胞(ATCC CRL-8066)、THP-1細胞(ATCC TIB-202)、U-937細胞(ATCC CRL-1593)などの白血病細胞株並びにそれら

の変異株が挙げられ、これらはいずれも増殖容易であり、しかも、当該酵素の産生能が高いので、この発明を実施するうえで有用である。殊に、HBL-38細胞、HL-60細胞、KG-1細胞、THP-1細胞及びU-937細胞を始めとするヒト骨髓単球系細胞株は当該酵素の産生能が抜きん出て高く、この発明の製造方法を実施するうえで極めて有用である。

【0015】後者の形質転換細胞は、上記のごとき細胞から採取される当該酵素をコードするDNAを哺乳類由来の適宜宿主細胞に導入することによって得ることができる。宿主細胞としては、例えば、3T3細胞(ATCC CCL-92)、C1271細胞(ATCC CRL-1616)、CHO-K1細胞(ATCC CCL-61)、CV-1細胞(ATCC CCL-70)、COS-1細胞(ATCC CRL-1650)、HeLa細胞(ATCC CCL-2)、MOP-8細胞(ATCC CRL-1709)及びそれらの変異株を始めとする、斯界において宿主として慣用されるヒト、サル、マウス及びハムスター由来の上皮系細胞株、間質系細胞株、神経芽細胞株及び造血系細胞株が用いられる。斯かる宿主細胞に当該酵素をコードするDNAを導入するには、例えば、公知のDEAE-デキストラン法、燐酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、さらには、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスなどによるウイルス感染法などを用いればよい。形質転換細胞から当該酵素を産生するクローンを選択するには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、形質転換体を培養培地で培養し、当該酵素の産生が観察されたクローンを選択すればよい。なお、哺乳類由来の宿主細胞を用いる組換えDNA技術については、例えば、黒木登志夫、谷口克、押村光雄編集、『実験医学別冊細胞工学ハンドブック』、1992年、羊土社発行や横田崇、新井賢一編集、『実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ3遺伝子クローニング実験法』、1993年、羊土社発行などにも詳述されている。

【0016】この発明の製造方法は、上述のごとき細胞を増殖させる工程と、得られる増殖細胞から目的とする酵素を採取する工程を含んでなる。細胞を増殖させる工程について言えば、そこで用いる方法に特に制限はなく、通常一般の生体外又は生体内の方法を適用すればよい。生体外の方法とは培養培地を用いて増殖させる方法をいい、培養培地としては、哺乳類由来の細胞を培養するための慣用の培養培地が用いられ、斯かる培養培地は、通常、緩衝水を基材とし、これにナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、燐イオン、塩素イオンなどの無機イオンと、細胞の代謝能力に応じた微量元素、炭素源、窒素源、アミノ酸、ビタミンなどを加え、必要に応じて、さらに血清、ホルモン、細胞成長

因子、細胞接着因子などを含有せしめて構成される。個々の培養培地としては、例えば、199培地、DMEM培地、Ham's F12培地、IMDM培地、MCD B104培地、MCD B153培地、MEM培地、RD培地、RITC80-7培地、RPMI-1630培地、RPMI-1640培地、WJ C404培地などが挙げられる。斯かる培養培地に細胞を約 $1 \times 10^4$ 乃至 $1 \times 10^7$ 個/ml、望ましくは、約 $1 \times 10^5$ 乃至 $1 \times 10^6$ 個/ml接種し、必要に応じて新鮮な培養培地と取換えながら、温度37℃前後で1日乃至1週間、望ましくは、2乃至4日間浮遊培養又は単層培養する。

【0017】一方、ヒト以外の温血動物を利用する生体内の方法により増殖させるには、通常、マウス、ヌードマウス、ラット、ヌードラット、モルモット、ハムスターなどの齧歯類の新生児にウサギ由来の抗胸腺抗体などを注射して免疫反応を減弱させた後、当該酵素の産生能を有する細胞を動物1匹当たり約 $1 \times 10^5$ 乃至 $1 \times 10^8$ 個皮下又は腹腔内に注射移植するか、あるいは、これら温血動物の成長個体の体外又は体内に設けられ、動物の栄養体液が環流可能な拡散チェンバーなどの容器内に細胞を収容し、その後、通常一般の方法により動物を約2乃至10週間飼育する。この飼育の間、移植した細胞は温血動物の体液を利用しながら増殖する。増殖細胞は細胞塊、腹水又は細胞浮遊液として採取され、必要に応じて、これを適宜分散媒中で分散・洗浄した後、目的とする酵素を採取する。生体内の増殖方法は、生体外の増殖方法と比較して、より少ないコストと労力で短時間に所望量の増殖細胞が得られる利点がある。なお、生体内の増殖方法は、例えば、同じ特許出願人による特公昭56-54158号公報などにも詳述されている。

【0018】増殖細胞から酵素を採取するには、増殖細胞を一旦分離するか培養上清とともに超音波を印加するか、低張媒体中に浸漬するなどして破碎し、得られる破碎物又は破碎物と培養上清との混合物に、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの酵素を精製するための斯界における慣用の方法を適用すればよく、これらは必要に応じて適宜組合せて適用される。特に、当該酵素に特異的なモノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーによるときは、高純度の当該酵素が最小のコストと労力で得られる。なお、細胞の種類や培養条件によっては、増殖中、産生した酵素が細胞外に放出されることがあるが、この場合には、培養上清からも当該酵素を採取できる。

【0019】なお、この発明において、当該酵素の活性は下記の方法により測定し、活性値(単位)で表示して

いる。すなわち、10% (w/v) スクロース、0.1% (w/v) 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート(以下、「CHAPS」と略記する。)及び2mMジチオトレイトールをそれぞれ含む25mMヘプス緩衝液(pH7.5)を395 $\mu$ lとり、これにN-(N-アセチル-L-チロシニル)-L-バリン-L-アラニン-L-アスパラギン酸-7-アミノ-4-メチルクマリナムイドの10mMジメチルスルホキシド溶液5 $\mu$ lと被検酵素溶液100 $\mu$ lをそれぞれ加え、30℃で1時間反応させる。反応中、反応の進行に伴って遊離する7-アミノ-4-メチルクマリニの量を、蛍光光度計により、波長355nmで励起して放出される蛍光の波長460nmにおける強度に基づき経時的にモニターする。当該酵素の1単位とは、斯かる条件で反応させたときに、1分間に7-アミノ-4-メチルクマリニを1ピコモル遊離する酵素の量と定義する。

【0020】この発明は、当該ポリペプチドの前駆体に斯かる酵素を作用させて活性型のポリペプチドに変換する方法を提供するものでもある。その実施態様としては、例えば、上記の方法により一旦分離した酵素を、当該ポリペプチドの前駆体に接触させるか、あるいは、当該酵素をコードするDNAと当該ポリペプチドの前駆体をコードする領域を含むDNAとを哺乳類由来の適宜宿主細胞に導入し、そこで両DNAを共発現させればよい。前者の場合には、当該ポリペプチドの前駆体の産生能を有する細胞、もしくは、形質転換によって、当該ポリペプチドの前駆体の産生能を有するに至った細胞を培養し、その培養物に上記の方法により採取した酵素を共存せしめるか、あるいは、培養物から細胞を分離するか分離することなく、必要に応じて、細胞を破碎した後、培養物又は細胞破碎物に当該酵素を添加すればよい。共存又は添加する酵素の量としては、通常、前駆体と当モル以下で事足り、また、温度及びpHとしては、酵素が作用し得るレベル、詳細には、温度約4乃至40℃、望ましくは、3-7℃前後、pH約6乃至9、望ましくは、pH約7乃至8に設定すればよく、原料の前駆体から活性型のポリペプチドが所望量生成するまで反応させる。なお、当該酵素をコードするDNAと当該ポリペプチドの前駆体をコードするDNAとを哺乳類由来の適宜宿主細胞に導入して得られる形質転換体のように、同一の細胞が当該ポリペプチドの前駆体と酵素をそれぞれ産生する場合には、当然のことながら、必ずしも酵素を添加する必要はなく、必要に応じて細胞を破碎した後、酵素が前駆体に作用して活性型のポリペプチドを生成し得る温度で細胞又は細胞破碎物を含む培養物をインキュベートすればよい。

【0021】斯くして得られた活性型のポリペプチドを含む培養物はIFN- $\gamma$ 誘導剤としてそのまま用いられることもあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、

超音波、細胞溶解酵素及び／又は界面活性剤により細胞を破碎した後、濾過、遠心分離などにより当該ポリペプチドを細胞又は細胞破碎物から分離し、精製する。精製には細胞又は細胞破碎物を除去した培養物に、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの生理活性ポリペプチドを精製するための斯界における慣用の方法が用いられ、必要に応じて、これらは適宜組合せて適用される。そして、最終使用形態に応じて、精製ポリペプチドを濃縮・凍結乾燥して液状又は固状にすればよい。なお、同じ特許出願人による特願平7-58240号明細書（特開平8-231598号）に開示されたモノクローナル抗体は当該ポリペプチドの精製に極めて有用であり、このモノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーによるときは、高純度の当該ポリペプチドを最小のコストと労力を得ることができる。

【0022】前述のとおり、この発明の方法により得られる活性型のポリペプチドは、有用な生理活性蛋白質であるIFN- $\gamma$ の産生を誘導する性質と、キラー細胞の細胞障害性を増強したり、キラー細胞の生成を誘導する性質を兼備するので、IFN- $\gamma$ 及び／又はキラー細胞に感受性を有する各種疾患の治療・予防に著効を発揮する。さらに、この発明の方法により得られる活性型のポリペプチドは強力なIFN- $\gamma$ 誘導能を有することから、一般に少量で所期のIFN- $\gamma$ を産生でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を惹起することがない。したがって、この発明の方法により得られる活性型のポリペプチドは、使用に際して用量を厳密に管理しなくても、所望のIFN- $\gamma$ 産生を迅速に誘導できる利点がある。なお、斯かるポリペプチドの感受性疾患剤としての用途は、同じ特許出願人による特願平8-28722号明細書に詳述されている。

【0023】以下、実施例に基づきこの発明を説明する。

【0024】

【実施例1】

〈酵素の製造〉常法により、生後間もないハムスターの新生児にウサギ由来の抗胸腺抗血清を腹腔内注射して免疫反応を減弱させた後、その背部皮下にヒト急性単球性白血病由来の骨髓単球系細胞株の一種であるTHP-1細胞(ATCC TIB-202)を約 $5 \times 10^5$ 個／匹注射移植し、通常一般の方法で3週間飼育した。皮下に生じた腫瘍塊(約15g／匹)を摘出し、常法により血清無含有のRPMI-1640培地(pH7.4)により分散させ、洗浄して増殖細胞を得た。

【0025】この増殖細胞を10mM塩化カリウム、

1. 5mM塩化マグネシウム及び0. 1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムをそれぞれ含む10倍容の氷冷した20mMヘベス緩衝液(pH7.4)により洗浄し、3倍容の新鮮な同一緩衝液中、氷冷下で20分間静置した後、-20℃で凍結した。凍結物を解凍し、プロテアーゼ阻害剤として1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、1 $\mu$ g／mlロイペプチン及び10 $\mu$ g／mlペプスタチンAをそれぞれ加えた後、テフロンホモジナイザーにより破碎し、破碎物を2,000 $\times$ gで10分間遠心分離し、上清を採取する一方、沈澱部を上記と同様に再度処理し、遠心分離して新たに得られた上清を上記上清と合一した。この上清にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを6mMになるように加え、24,000 $\times$ gで20分間遠心分離して細胞膜片を除去した後、100,000 $\times$ gでさらに60分間遠心分離してミクロソーム画分とサイトソール画分に分離し、サイトソール画分を採取した。

【0026】このサイトソール画分に氷冷下で硫酸アンモニウムを40%飽和になるように加え、攪拌した後、遠心分離して上清を採取した。この上清に硫酸アンモニウムを80%飽和になるようにさらに加え、攪拌した後、遠心分離して沈澱部を採取した。この沈澱を5%(v/v)グリセロール、0.1%(w/v)CHAPS及び2mMジチオトレイトールをそれぞれ含む20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.8)に溶解し、新鮮な同一緩衝液に対して4℃で16時間透析し、透析内液を遠心分離して上清を採取し、膜濾過した後、新鮮な同一緩衝液により平衡化しておいた東ソー製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『DEAE 5PW』のカラムに負荷した。そして、0Mから0.5Mまで上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに新鮮な同一緩衝液を通液し、塩化ナトリウム濃度が40乃至90mMで溶出した画分を採取し、合一した。

【0027】この画分を5%(v/v)グリセロール、0.1%(w/v)CHAPS及び2mMジチオトレイトールをそれぞれ含む20mMヘベス緩衝液(pH7.4)により1.5倍に希釈した後、希塩酸によりpH7.4に調整した。次いで、新鮮な同一緩衝液により平衡化しておいたファルマシア製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『S-セファロース』のカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液により洗浄した後、0Mから0.5Mまで上昇する塩化カリウムの濃度勾配下、カラムに新鮮な同一の緩衝液を通液し、塩化カリウム濃度が10乃至100mM付近で溶出した画分を採取した。

【0028】採取した画分を合一し、5%(v/v)グリセロール、0.1%(w/v)CHAPS及び2mMジチオトレイトールをそれぞれ含む20mMヘベス緩衝液(pH7.4)に対して16時間透析した後、新鮮な同一緩衝液により平衡化しておいたファルマシア製イオン交換クロマトグラフィー用カラム『モノS』に負荷

し、0.5M塩化カリウムを含む新鮮な同一緩衝液を通液した。

【0029】『モノS』カラムからの溶出画分から酵素活性ある画分を採取し、合一し、濃縮した後、5% (v/v) グリセロール、0.1% (w/v) CHAPS及び2mMジチオトレイトールをそれぞれ含む20mMヘス緩衝液 (pH7.4) により平衡化しておいたファルマシア製ゲル濾過クロマトグラフィー用カラム『スーパーデックス200』に負荷し、新鮮な同一緩衝液を通液し、溶出画分から酵素活性ある画分を採取し、合一し、濃縮したところ、当該酵素を約9,000単位/m1含む溶液が約1m1得られた。収量は、ハムスター1匹当たり約45単位であった。

#### 【0030】

##### 【実施例2】

〈酵素の分子量〉ファルマシア製ゲル濾過クロマトグラフィーカラム『スーパーデックス75HR』(ゲル用量24ml)を燐酸緩衝食塩水(以下、「PBS」と略記する。)により平衡化した後、実施例1の方法により得た酵素溶液を200 $\mu$ l負荷し、溶出液の酵素活性をモニターしながら、カラムに新鮮なPBSを0.5ml/分の流速で通液した。つぎに、ゲル濾過クロマトグラフィー用分子量マーカーとして、ウシ血清アルブミン(67,000ダルトン)、オボアルブミン(43,000ダルトン)、キモトリプシノーゲンA(25,000ダルトン)及びリボヌクレアーゼA(13,700ダルトン)の適量をそれぞれPBSに溶解した後、酵素活性の測定に代えて、溶出液の蛋白質濃度を波長280nmにおける吸光度によりモニターした以外は、酵素溶液の場合と同様に処置した。得られたクロマトグラムにおける酵素及び各分子量マーカーの溶出位置に基づき計算したところ、ゲル濾過クロマトグラフィーによるこの発明の酵素の分子量は約30,000ダルトンであった。

【0031】さらに、上記で得られたこの発明の酵素を含む『スーパーデックス75HR』の溶出画分を濃縮した後、ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、680乃至685頁(1970年)に報告している方法に準じ、還元剤としての2% (w/v) ジチオトレイトール存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した。サンタ・クルーズ製抗ヒトICE-p20抗体及び抗ヒトICE-p10抗体を用い、常法にしたがってゲルを免疫染色した後、アマシャム製発色キット『ECL kit』により発色させたところ、分子量約25,000ダルトン及び約10,000ダルトンに相当する位置に蛋白質の単一バンドがそれぞれ観察された。なお、このとき用いた分子量マーカーは、ウシ血清アルブミン(67,000ダルトン)、オボアルブミン(45,000ダルトン)、カーボニックアンヒドラーゼ(30,000ダルトン)、大豆トリプシンインヒビター(20,100ダルトン)及び $\alpha$ -ラクトアルブ

ミン(14,400ダルトン)であった。

#### 【0032】

##### 【実施例3】

〈酵素の部分アミノ酸配列〉実施例1の方法により得たこの発明の酵素を含む溶液を5% (v/v) グリセロール及び2mMジチオトレイトールをそれぞれ含む20mMヘス緩衝液 (pH7.4) に対して透析した後、遠心濃縮機により濃縮した。常法にしたがって、濃縮物を還元剤としての2% (w/v) ジチオトレイトール存在下、ゲル濃度15% (w/v) のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、二弗化ポリビニル膜に転写し、クーマシーブリリアントブルーにより染色した後、分子量約25,000ダルトン及び約10,000ダルトンに相当するバンドを切出した。

【0033】常法にしたがって、切出したゲルから蛋白質成分をそれぞれ抽出し、パーギン・エルマー製プロテイン・シーケンサー『473A型』を用いてN末端付近のアミノ酸配列を調べたところ、分子量約25,000ダルトンのバンドから抽出した成分は、部分アミノ酸配列として、N末端に配列表における配列番号4(ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、アスパラギン又はアスパラギン酸を表すものとする。)に示すアミノ酸配列を、一方、分子量約10,000ダルトンのバンドから抽出した成分は、N末端に配列表における配列番号5に示すアミノ酸配列を含有することが判明した。このことは、この発明の酵素が、分子量の相違する2種類のサブユニットを含んでなることを示している。

#### 【0034】

##### 【実施例4】

##### 〈酵素作用〉

#### 【0035】

##### 【実施例4-1】

〈前駆体の調製〉0.5ml容反応管に10 $\times$ PCR緩衝液を10 $\mu$ l、2.5mM dNTPを1 $\mu$ l、5単位/ $\mu$ l Taq DNAポリメラーゼを0.5 $\mu$ l、そして、同じ特許出願人が特願平7-262062号明細書(特開平8-193098号)に開示した組換えDNA『pHIGIF』を1ngとり、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号7に示した当該ポリペプチドをコードする領域を含むcDNAの塩基配列に基づき化学合成した5'-AAGGCCAGTGTGCTGGGCCTGGACAGTCAGCAAGG-3'及び5'-ACAGCCAGTGTGATGGCTAGTCTTCGTTTGAACAG-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ20ピコモル加え、滅菌蒸留水で100 $\mu$ lとした。常法により、この混液を94 $^{\circ}$ Cで1分間、60 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間反応させるサイクルを30回繰返してPCR反応させた。なお、PCR反応試薬としては、宝酒造製『タカラPCRアンプリフィケーション』



ンキット』を用いた。

【0036】得られた反応物を常法にしたがって制限酵素Bst XIにより切断し、得られた約800塩基対のDNA断片を0.1μgとり、これを適量の滅菌蒸留水に溶解し、あらかじめ制限酵素Bst XIにより切断しておいたインビトロジェン製プラスミドベクター『pRc/CMV』を10ngと適量の10×ライゲーション緩衝液及びT4 DNAリガーゼをそれぞれ加え、さらに10mM ATPを最終濃度1mMまで加えた後、16℃で18時間反応させてDNA断片をプラスミドベクター『pRc/CMV』に挿入した。得られた組換えDNAをコンピテントセル法により大腸菌JM109株に導入して形質転換体とし、これをアンピシリンを50μg/ml含むL-ブロス培地(pH7.2)に接種し、37℃で18時間培養した後、培養物から菌体を採取し、アルカリ-SDS法により組換えDNAを抽出した。この組換えDNAを『pRCHuGF』と命名する一方、その塩基配列をジデオキシ法により調べたところ、図1に示す構造を有していた。図1に見られるように、この組換えDNA『pRCHuGF』においては、当該ポリペプチドの前駆体をコードする、配列表における配列番号7に示す塩基配列を含有するcDNA『HuIGIF』が、サイトメガロウイルス・プロモーター『PCMV』の下流に連結されていた。

【0037】別途、常法にしたがって、チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO-K1細胞(ATCC CCL-61)を10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したHam's F12培地(pH7.2)に接種し、増殖させた。増殖細胞を採取し、PBSにより洗浄した後、細胞密度 $1 \times 10^7$ 個/mlになるようにPBSに浮遊させ、その浮遊液の0.8mlを組換えDNA『pRCHuGF』10μgとともにキュベットにとり、10分間氷冷した後、バイオラッド製エレクトロポレーション装置『ジーンパルサー』に装着し、放電パルスを一回印加した後、直ちにキュベットを取出し、10分間氷冷した。次いで、細胞浮遊液をキュベットから取出し、10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したHam's F12培地(pH7.2)に接種し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で3日間培養した後、培養培地にG418を最終濃度400μg/mlになるように加え、同じ条件でさらに3日間培養した。斯くして得られた100個余りのコロニーから48個を選別し、その一部をG418を400μg/ml含み、10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したHam's F12培地(pH7.2)を分注した培養プレートに接種し、上記と同様に1週間培養した。その後、培養プレートの各ウェルに5.1mM塩化マグネシウム、0.5%(w/v)デオキシコル酸、1%(w/v)ノニデットP-40、10μg/mlアプロチニン及び0.1%(w/v)SDSをそれぞれ含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH

8.5)を適量加えて細胞を溶解した。

【0038】細胞溶解物をそれぞれ50μlとり、グリセロール50μlとジチオトレイトールを最終濃度2%(w/v)になるようにそれぞれ加え、37℃で1時間静置した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、細胞溶解物中のポリペプチドを分離した。次いで、常法にしたがって、ゲル内で分離されたポリペプチドをニトロセルロース膜に転写し、別途調製しておいた、同じ特許出願人が特願平7-58240号明細書(特開平8-231598号)に開示した当該ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマH-1株の培養上清に1時間浸漬した後、0.05%(v/v)ツイーン20を含む20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄して過剰のモノクローナル抗体を除去した。その後、ニトロセルロース膜を西洋ワサビ由来のパーオキシダーゼで標識したウサギ由来の抗マウスIgGグロブリン抗体を含むPBSに1時間浸漬し、0.05%(v/v)ツイーン20を含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)により洗浄し、0.005%(v/v)過酸化水素及び0.3mg/mlジアミノベンジジンをそれぞれ含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に浸漬して発色させた。その発色度に基づき、当該ポリペプチドの前駆体の産生能が高い形質転換体のクローンを選別し、これを『RCHuGF』と命名した。

【0039】この形質転換体『RCHuGF』を400μg/ml G418を含み、10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したHam's F12培地(pH7.2)を分注した角形培養瓶に接種し、培養培地を適宜新鮮なものとの交換えながら、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で1週間培養した。その後、培養瓶にギブコ製トリプシン剤『トリプシン-EDTA』を適量加えて培養瓶内壁に付着した細胞を剥離し、PBSで洗浄した後、さらに10mM塩化カリウム、1.5mM塩化マグネシウム及び0.1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩をそれぞれ含む氷冷した20mMヘペス緩衝液(pH7.4)により洗浄し、3倍容の新鮮な同一緩衝液中、氷冷下で20分間静置した。その後、常法にしたがって細胞を破碎し、10,000×gで30分間遠心分離し、当該ポリペプチドの前駆体を含む上清部を採取した。この前駆体は、還元剤存在下のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において分子量約24,000ダルトンを示し、N末端に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有している。

【0040】

【実施例4-2】

〈前駆体の変換〉10%(v/v)グリセロール、0.1%(w/v)CHAPS及び2mMジチオトレイトールをそれぞれ含む100mMヘペス緩衝液(pH7.4)に実施例4-1の方法により得た当該ポリペプチド



の前駆体を500 nMになるように溶解して基質溶液とした。この基質溶液に実施例1の方法により得た酵素を350単位/ml加え、37℃でインキュベートした。インキュベート開始から0分後、10分後、30分後、1時間後、3時間後、6時間後及び18時間後に反応物の一部をそれぞれ採取し、ヨードアセトアミドを最終濃度200 µg/mlになるように加えて反応を停止させた。採取した反応物に同じ特許出願人が特願平7-58240号明細書(特開平8-231598号)に開示したモノクローナル抗体を用いるウェスタン・ブロッティング法を適用し、当該ポリペプチドの前駆体が活性型のポリペプチドに変換される経時変化を調べた。

【0041】同時に、ヒト急性骨髄性白血病由来の骨髄単球系細胞株の一種であるKG-1細胞(ATCC CCL-246)を用いるバイオアッセイ法により、経時的に採取した反応物における活性型のポリペプチドの含有量を推定した。すなわち、KG-1細胞を10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI-1640培地(pH7.4)に細胞密度 $1.5 \times 10^6$  個/mlになるように浮遊させ、96ウェルマイクロプレートに0.1 ml/ウェルずつ分注した。採取した反応物を10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI-1640培地(pH7.4)により適宜希釈した後、これを上記マイクロプレートに0.1 ml/ウェルずつ分注し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で24時間培養した。培養後、各ウェルから培養上清を0.1 mlずつ採取し、通常の酵素免疫測定法によりIFN-γ含量を測定した。結果を表1に示す。なお、表1に示すIFN-γ含量は、米国国立衛生研究所(NIH)から入手したIFN-γ標準品(Gg23-901-530)に基づき国際単位(IU)に換算している。

【0042】

【表1】

反応時間	IFN-γ 含量 (IU/ml)
0 分	280
10 分	750
30 分	1,000
1 時間	1,800
3 時間	3,100
6 時間	3,900
18 時間	4,200

【0043】図2のウェスタン・ブロッティングに見られるように、本例の反応条件下においては、前駆体に相当する分子量約24,000ダルトンのバンドが反応開

始から3時間までに漸次消滅し、それに伴って、活性型のポリペプチドに相当する分子量18,200ダルトンのバンドが出現した。表1のIFN-γ含量もこの結果とよく符合しており、分子量18,200ダルトンのバンドの出現に伴って反応物のIFN-γ誘導能が漸次上昇した。これらの結果は、この発明の酵素が当該ポリペプチドの前駆体に作用し、免疫担当細胞においてIFN-γの産生を誘導する活性型のポリペプチドに変換したことを示している。

【0044】

【実施例4-3】

〈活性型ポリペプチドの理化学的性質〉

【0045】

【実施例4-3(a)】

〈活性型ポリペプチドの精製〉実施例4-2の方法により18時間反応させて得た反応物を10mM磷酸緩衝液(pH6.8)に対して透析した後、10mM磷酸緩衝液(pH6.8)で平衡化しておいた東ソー製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『DEAE 5PW』のカラムに負荷し、0Mから0.5Mまで直線的に上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10mM磷酸緩衝液(pH6.8)を通液し、塩化ナトリウム濃度が0.2乃至0.3M付近で溶出した画分を採取した。

【0046】この新たに得られた画分を合一し、PBSに対して透析する一方、同じ特許出願人による特願平7-58240号明細書(特開平8-231598号)に記載された方法にしたがってモノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィー用ゲルを調製し、これをプラスチック製円筒管内部にカラム状に充填し、PBSで洗浄した後、上記透析内液をカラムに負荷した。カラムに100mMグリシン-塩酸緩衝液(pH2.5)を通液し、得られる溶出画分から免疫担当細胞においてIFN-γの産生を誘導する活性型のポリペプチドを含む画分を採取し、滅菌蒸留水に対して透析し、膜濾過により濃縮した後、凍結乾燥して精製された活性型ポリペプチドの固状物を得た。

【0047】

【実施例4-3(b)】

〈ポリペプチドの分子量〉実施例4-3(a)の方法により得た精製ポリペプチドをユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、680乃至685頁(1970年)に報告している方法に準じ、還元剤としての2% (w/v) ジチオトレイトール存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、分子量約18,000乃至19,500ダルトンに相当する位置にIFN-γ誘導能あるポリペプチドの主バンドが観察された。このことは、この発明の酵素が分子量約24,000ダルトンの当該ポリペプチドの前駆体に作用し、これをより低分子量の活性型のポリペプチドに変換したことを示している。なお、このときの分子量マーカーは、ウ

シ血清アルブミン(67,000ダルトン)、オボアルブミン(45,000ダルトン)、カーボニックアンヒドラーゼ(30,000ダルトン)、大豆トリプシンインヒビター(20,100ダルトン)及び $\alpha$ -ラクトアルブミン(14,400ダルトン)であった。

【0048】

【実施例4-3(c)】

〈ポリペプチドのN末端アミノ酸配列〉パーキン・エルマー製プロテイン・シーケンサー『473A型』を使用し、常法にしたがって分析したところ、実施例4-3(a)の方法により得た活性型のポリペプチドはN末端に配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を含有していた。このことは、この発明の酵素が当該ポリペプチドの前駆体に作用し、そのN末端アミノ酸配列である配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列における第36番目のアスパラギン酸と第37番目のチロシンの間のペプチド結合を切断したことを示している。

【0049】

【実施例5】

〈酵素に対する活性阻害剤〉実施例4-2に記載した前駆体の変換方法において、実施例1の方法により得たこの発明の酵素とともに5 $\mu$ M Ac-YVAD-CHO及び650 $\mu$ Mヨードアセトアミドのいずれかを加え、37℃で3時間反応させた。各反応物を還元剤としての2%(w/v)ジチオトレイトールの存在下、ゲル濃度15%(w/v)のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後、同じ特許出願人が特願平7-58240号明細書(特開平8-231598号)に開示したモノクローナル抗体を用いるウェスタン・ブロッティング法を適用したところ、いずれの反応物においても、活性型のポリペプチドに相当するバンドがゲル上に観察されなかった。このことは、Ac-YVAD-CHO及びヨードアセトアミドがこの発明の酵素に対する活性阻害剤として作用することを示している。

【0050】

【実施例6】

〈酵素の製造〉孔径0.5ミクロンのメンブランフィルターを取付けた内容量約10mlのプラスチック製円筒型拡散チェンバー内にRPMI-1640培地(pH7.4)によりヒト組織球性リンパ腫由来の骨髓単球系細胞株の一種であるU-937細胞(ATCC CRL-1593)を浮遊させ、成長ラットの腹腔内に埋設した。この状態でラットを通常一般の方法で4週間飼育した後、拡散チェンバーを取出した。拡散チェンバーから増殖細胞を採取し、PBSで洗浄した後、実施例1と同様にして破碎し、破碎物を精製したところ、当該酵素がラット1匹当たり約5単位の収量で得られた。

【0051】斯くして得られた酵素の理化学的性質を実配列

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met Lys

実施例2乃至5の方法により調べたところ、実施例1の酵素と同様の酵素作用、分子量及び部分アミノ酸配列をそれぞれ有し、Ac-YVAD-CHO及びヨードアセトアミドにより酵素活性が阻害された。

【0052】

【実施例7】

〈酵素の製造〉ヒト急性前骨髄性白血病由来の骨髓単球系細胞の一種であるHL-60細胞(ATCC CCL-240)を10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI-1640培地(pH7.2)に細胞密度約 $3 \times 10^5$ 個/mlになるように浮遊させ、培養培地を新鮮なものと取換えながら、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で3週間培養した。培養物から増殖細胞を分離し、PBSで洗浄した後、実施例1と同様にして破碎し、破碎物を精製したところ、当該酵素が培養物1l当たり約30単位の収量で得られた。

【0053】斯くして得られた酵素の理化学的性質を実施例2乃至5の方法により調べたところ、実施例1の酵素と同様の酵素作用、分子量及び部分アミノ酸配列をそれぞれ有し、Ac-YVAD-CHO及びヨードアセトアミドにより酵素活性が阻害された。

【0054】

【発明の効果】以上説明したごとく、この発明は、免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導するポリペプチドの前駆体を活性型のポリペプチドに変換する酵素の発見に基づくものである。この発明の酵素は斯かる作用を具備するので、これを当該ポリペプチドを本来産生する細胞や当該ポリペプチドをコードするDNAを導入することによって形質転換した哺乳類由来の宿主細胞が産生する当該ポリペプチドの前駆体に作用させるか、当該酵素をコードするDNAを当該ポリペプチドをコードするDNAとともに哺乳類由来の宿主細胞に導入し、両DNAを同一の細胞内で共発現させることにより、ヒト細胞におけると同様のプロセッシングを受けた活性型のポリペプチドが得られることとなる。斯かる酵素は、給源として細胞を用いるこの発明の方法により、所望量製造することができる。

【0055】この発明は斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な、意義のある発明であると言える。

【0056】

【配列表】

配列番号:1

配列の長さ:41

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:N末端フラグメント

19 20  
 1 5 10 15  
 Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn Leu Glu  
 20 25 30  
 Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu  
 35 40

【0057】配列番号:2

配列の長さ:193

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ポリペプチド

配列

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met  
 -35 -30 -25  
 Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn  
 -20 -15 -10 -5  
 Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile  
 1 5 10  
 Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro  
 15 20 25  
 Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg  
 30 35 40  
 Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met  
 45 50 55 60  
 Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys  
 65 70 75  
 Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile  
 80 85 90  
 Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly  
 95 100 105  
 His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe  
 110 115 120  
 Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys  
 125 130 135 140  
 Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu  
 145 150 155  
 Asp

【0058】配列番号:3

配列の長さ:5

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:N末端フラグメント

配列の長さ:19

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:N末端フラグメント

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu  
 1 5

【0059】配列番号:4

配列

Xaa Pro Ala Met Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Gly Asn Val Lys Leu  
 1 5 10 15  
 Cys Ser Leu

【0060】配列番号:5

配列の長さ:14

トポロジー:直鎖状

50 配列の種類:ペプチド

21

22

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Ala Ile Lys Lys Ala His Ile Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe

1

5

10

【0061】配列番号：6

配列の長さ：157

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn

1

5

10

15

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp

20

25

30

Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile

35

40

45

Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile

50

55

60

Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile

65

70

75

80

Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys

85

90

95

Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys

100

105

110

Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu

115

120

125

Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu

130

135

140

Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp

145

150

155

【0062】配列番号：7

配列の長さ：579

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号：leader peptide

30 存在位置：1..108

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：109..579

特徴を決定した方法：S

配列

ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA ATG 48

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met

-35

-30

-25

AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA GCT GAA GAT GAT GAA AAC 96

Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn

-20

-15

-10

-5

CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA 144

Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile

1

5

10

AGA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT 192

Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro

15

20

25

CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG 240

Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg

30

35

40

23 24  
 ACC ATA TTT ATT ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG 288  
 Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met  
 45 50 55 60  
 GCT GTA ACT ATC TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA AYT CTC TCC TGT 336  
 Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys  
 65 70 75  
 GAG AAC AAA ATT ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC 384  
 Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile  
 80 85 90  
 AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA 432  
 Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly  
 95 100 105  
 CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT 480  
 His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe  
 110 115 120  
 CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA 528  
 Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys  
 125 130 135 140  
 GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA 576  
 Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu  
 145 150 155  
 GAC 579  
 Asp

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】当該ポリペプチドの前駆体をコードする cDNA を含む組換え DNA『pRCHuGF』の構造を示す図である。

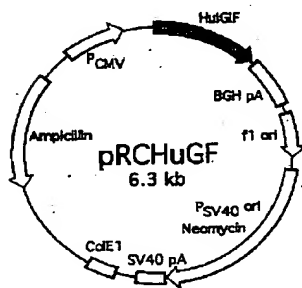
【図 2】ウェスタン・ブロッティング法により可視化した、当該ポリペプチドの前駆体から活性型のポリペプチ

ドが生成する経時変化を示すゲル電気泳動像をディスプレイ上に表示した中間調画像である。

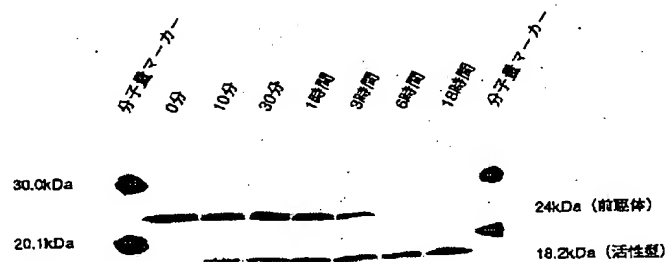
## 【符合の説明】

PCMV サイトメガロウイルス・プロモーター  
 HuIGIF 当該ポリペプチドの前駆体をコードする cDNA

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C12P 21/02

//(C12N 5/10

C12R 1:91 )

(C12P 21/02

識別記号

庁内整理番号

9282-4B

F I

15/00

ZNA

A

技術表示箇所

C12R 1:91 )